

PCT/EP 00/04011
H 3
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



4
Bescheinigung

REC'D	30 MAY 2000
WIPO	PCT

Die Bayer AG in Leverkusen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Organ-, gewebs- und zellspezifisches Immuntherapeutikum für chronische virale Infektionen, sowie entzündliche, degenerative und proliferative Erkrankungen insbesondere der Leber sowie Krebs auf der Basis von rekombinantem Parapoxvirus"

am 14. Mai 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol A 61 K 39/12 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 24. März 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Ebert

Aktenzeichen: 199 22 407.2

Organ-, gewebs- und zellspezifisches Immuntherapeutikum für chronische virale Infektionen, sowie entzündliche, degenerative und proliferative Erkrankungen insbesondere der Leber sowie Krebs auf der Basis von rekombinantem Parapoxvirus

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und den Einsatz von rekombinantem Parapoxvirus zur organ-, gewebs-und/oder zellspezifisch zielgerichteten Immuntherapie von viralen Infektionen, sowie entzündlichen, degenerativen, proliferativen Erkrankungen, insbesondere der Leber, und Krebs. Sie betrifft weiter die Verwendung von rekombinantem Parapoxvirus mit Targetingeigenschaften zur Herstellung von Arzneimitteln.

10

15

In den Anwendungsbereich der oben genannten Parapoxviren fallen auch Erkrankungen der Haut und ihrer Anhangsgebilde, der inneren Organe, des Zentralnervensystems und seiner Anhangsgebilde einschließlich des Auges, sowie Krebs, bei Mensch und Tier.

20

25

Es ist bekannt, daß latente und chronisch persistente virale Infektionen durch eine Immunsuppression aktiviert bzw. reaktiviert werden können, oder umgekehrt, daß das Immunsystem die akute Erkrankung, die durch ein Virus, das latent ist, hervorgerufen werden kann, unterdrückt (z.B. rekurriert eine latente Herpesvirus-Infektion bei Immunsuppression: Lippenbläschen bei Streß oder Kortisongabe). Es ist weiter bekannt, daß chronisch persistente und latente virale Infektionen schwer oder garnicht mit herkömmlichen antiviralen Substanzen auf niedermolekularer Basis therapierbar sind.

30

Ein Grund dafür kann die fehlende virale enzymatische Aktivität bei solchen Infektionen sein (beispielsweise das Fehlen einer viralen Polymerase-Aktivität, die einen nukleosidischen Inhibitor erst in die virale Nukleinsäure einbauen muß, damit dieser z.B. zum Kettenabbruch in der viralen DNA führen kann; beispielsweise das

Fehlen einer viralen Thymidinkinase-Aktivität, die z.B. eine antivirale Verbindung erst phosphorylieren muß, damit diese aktiv werden kann) oder aber die fehlende Erkennung infizierter Zellen oder viraler Antigene durch das Immunsystem des Wirtes.

5

Bekannt ist ebenfalls, daß bei chronisch persistierenden viralen Infektionen eine Superinfektion mit einem anderen Virus zu antiviralen, gegen das chronisch persistierende Virus gerichteten Effekten führen kann. 1) Die Abhängigkeit dieses Effektes von Interferonen (v.a. IFN- γ) und TNF- α , die von T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen sezerniert werden, konnte von den Autoren gezeigt werden.

10

Die Ergebnisse dieser Autoren bestätigte eine andere frühere Studie, in der gezeigt wurde, daß Class-I-restringierte cytotoxische T-Zellen die hepatozelluläre HBV-Genexpression in HBV- transgenen Mäusen hemmen konnten, daß dieser Prozeß ohne Zerstörung der Leberzellen ablief und daß der Prozeß durch TNF- α und IFN- γ -hervorgerufen wurde ²⁾.

15

In der tiermedizinischen Praxis wird seit längerer Zeit ein Produkt zur Induktion „paraspezifischer Immunität“, ein sogenannter Paramunitätsinducer therapeutisch, meta- und prophylaktisch eingesetzt. Diese Paramunitätsinducer bestehen z.B. aus chemisch inaktiviertem Parapoxvirus ovis. Ein auf der Basis dieses Virus (Parapoxvirus ovis, Strain D 1701) hergestelltes Produkt ist BAYPAMUN® (DE 3504940).

20

Das inaktivierte Virus induziert im Tier einen unspezifischen Schutz gegenüber Infektionen mit den verschiedensten Erregern. Man nimmt an, daß dieser Schutz über verschiedene Mechanismen des organismus-eigenen Abwehrsystems vermittelt wird.

25

Dazu zählen: Induktion von Interferon, Aktivierung der natürlichen Killerzellen, Induktion der „Kolonien-Stimulierenden Aktivität“ (CSA), sowie Stimulierung der

30

Lymphozytenproliferation. Frühere Untersuchungen zum Wirkmechanismus zeigten die Stimulation von Interleukin 2 und Interferon- γ^3).

5 Bekannt ist ebenfalls, daß Parapoxviren als Vektoren mit Genen von anderen Erregern versehen werden können, um entsprechende Proteine exprimieren zu können und so einen prophylaktischen Immunschutz (Vaccinierung) gegen den Spendererreger zu erzeugen. ⁴⁾

10 Es ist weiter bekannt, daß rekombinante sogenannte „pseudotyped“ Viren ursprünglich nicht infizierbare Ziel-Zellen, -Gewebe, -Organe bzw. -Wirtszellen infizieren können ⁵⁾.

15 Basierend auf solchen Erkenntnissen wurde bereits der zielgerichtete Einsatz von gentherapeutischen Vektoren diskutiert ⁶⁾.

20 In der Pharmakologie bedient man sich natürlicher und synthetischer Moleküle, wie beispielsweise des Asialofetuin bzw. poly-L-Lysin, um bestimmte Organe - im Falle der hier genannten Beispiele die Leber - aufgrund der Wechselwirkung mit organ-spezifischen Rezeptoren - im Falle der hier genannten Beispiele des Asialoglycoproteinrezeptors der Leber - mit diesen Molekülen selektiv für eine Therapie zugänglich zu machen ⁷⁾.

25 Vor diesem Hintergrund stellt sich daher die Aufgabe, die therapeutische Nutzbarkeit der ausgezeichneten Immunogenen Wirkung von Parapoxvirus ovis dahingehend weiter zu verbessern, daß die oben beschriebene generalisierte paraspezifische Immunogenität des Parapoxvirus gezielt auf das erkrankte Organ-(system) und den Krankheits-Erreger gelenkt werden kann.

30 Eine solche Fokussierung ließe einen nebenwirkungsärmeren und am Wirkort stärkeren und nachhaltigeren therapeutischen Effekt erwarten.

Aufgabe der Erfindung war es deshalb, die immunologische Wirkung des Parapoxvirus zielgerichtet zu erzeugen. Die Aufgabe wird gelöst durch das Einführen geeigneter Fremd-Peptide oder Proteine in das Virus mit der Fähigkeit zur Interaktion mit Organ-, Gewebe- und/oder zellspezifischen Rezeptormolekülen.

5

So erreichten wir eine starke Fokussierung der Immunreaktion. Damit wird es erstmals möglich, mit Hilfe von Parapoxvirus ovis die komplexe Kapazität des Immunsystems am Ort des Bedarfs zu konzentrieren.

10

Die sich daraus ergebenden Vorteile bestehen in der Gewebe-, Organ-, bzw. Zellspezifität bei gleichzeitiger Verstärkung der immunologischen Wirkung am Ort des Bedarfs und in der Verringerung von Nebenwirkungen.

15

Da man mit den bisher bekannten Methoden/Produkten bei systemischer Applikation einerseits unerwünschte Nebenwirkungen allgemeiner Art in Kauf nehmen muß und/oder andererseits nur eine ungenügende Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort erreicht, kann man mit der hier dargestellten neuen Qualität von Parapoxvirus ovis gezielter und effektiver therapieren.

20

Für die Herstellung rekombinanten Parapoxvirus ovis zur zielgerichteten organ-, gewebs- und/oder zell-spezifischen Immuntherapie kann man bekannte virale Proteine/Peptide verwenden, die sowohl unmodifiziert als auch modifiziert, verlängert, oder verkürzt sein können. Als in diesem Zusammenhang besonders geeignet hat sich dabei z.B. das große Hüllprotein des humanen Hepatitis B Virus (HBV) zum Erreichen der Leber erwiesen.

25

Weiter können nichtvirale Proteine/Peptide, insbesondere das Asialoglycoprotein, zur zielgerichteten Therapie der Leber verwendet werden.

Möglich ist auch die Verwendung neuer synthetischer Proteine/Peptide deren Sequenzen mittels dem Fachmann geläufiger Techniken zum Beispiel aus Phagen-Bibliotheken identifiziert werden können ⁸⁾.

- 5 Zusätzlich zu den erwähnten Peptiden oder Proteinen können immunmodulatorische Epitope beispielhaft ausgewählt aus Hepatitis B Virus oder anderen Viren, oder tumorassoziierte Antigene, in das Parapoxvirus inkloniert werden.

10 Damit wird eine starke, spezifische immunstimulatorische Eigenschaft gegen den Erreger oder den Tumor in das Parapoxvirus eingeführt.

Die Identifizierung geeigneter Epitope erfolgt mit bekannten, dem Fachmann geläufigen Techniken, wie beispielsweise der Flowzytometrie ⁹⁾.

- 15 Die Herstellung und Charakterisierung neuer rekombinanter Viren mit den beschriebenen Eigenschaften kann beispielhaft, wie im Folgenden aufgeführt, durchgeführt werden:

20 Herstellung eines rekombinanten Virus, dem Sequenzen fehlen, deren Genprodukte oder Teile davon nicht für die immunmodulatorische Wirkung oder für die Virusreplikation notwendig sind.

- 25 Ein Beispiel für die Klonierung des rekombinanten Parapoxvirus ovis geht von der Konstruktion von Doppelselektionskassetten aus, die ein Markergen, z. B. das LacZ-Gen unter Kontrolle des Vaccinia 11K-Gens oder einer anderen geeigneten Sequenz und ein anderes Selektionsmarkergen, z.B. das gpt-Gen (kodiert für das Enzym Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, XGPRT) unter Kontrolle des VEGF-Promotors exprimieren. Die Deletion viraler Sequenzen kann dann beispielhaft wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt werden:

Singuläre Restriktionsschnittstellen in einem sowohl für die virale Replikation, als auch für die immunmodulatorische Wirkung nicht essentiellen Bereich von Parapoxvirus ovis, (z.B. VEGF-Gen) werden als Startpunkte verwendet, um eine bidirektionale Deletion von Sequenzen durch Einwirkung der Endonuklease Bal31 zu bewirken.

Hierzu wird beispielsweise das entsprechende Plasmid, das die Nukleinsäuresequenz aus Parapoxvirus ovis enthält, im VEGF-Gen mit einem geeigneten Restriktionsenzym geöffnet und das nunmehr linearisierte Plasmid mit Bal31 inkubiert. Geeignete Deletionsplasmide werden aufgefüllt und hierauf komplementäre Oligonukleotide, die neue singuläre Schnittstellen, z.B. SmaI, SalI und EcoRV-Restriktionsschnittstellen darstellen, an die mit glatten Enden versehenen Bal 31-Produkte ligiert.

Nach der Transformation von Bakterien kann die Plasmid-DNA isoliert und mit einem Enzym gespalten werden, das in der Sequenz des entsprechenden Parapoxvirus ovis DNA-Fragmentes keine Erkennungsstelle enthält. Nach Insertion der mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittenen LacZ/gpt-Selektionskassette in die Deletionsstelle im VEGF-Gen kann die genaue Größe der erzeugten Deletionen in jeder resultierenden rekombinanten Plasmid-DNA durch Sequenzieren bestimmt werden.

Das Virus, dem dann das entsprechende Genprodukt oder eines Teiles davon fehlt, kann beispielhaft wie folgt hergestellt werden:

Konfluent ausgewachsene geeignete Zellen wie beispielsweise Rindernierenzellen werden mit einer Infektionsdosis von ca. 0,1 Multiplicity of infection (moi) infiziert. Nach etwa zwei Stunden werden die infizierten Zellen mit einem wie oben beschriebenen hergestellten Deletionsplasmid (z.B. 10 µg) beispielsweise unter Verwendung dem Fachmann geläufiger und kommerziell erhältlicher Transfektionssysteme transfiziert. Anschließend werden diese Zellkulturen mit einem geeigneten Selektionsmedium (z.B. mit HAT-Medium [Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin], MPA

[Mycophenolsäure]) während 3 bis 6 Tagen bei ungefähr 37°C und etwa 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert bis ein zytopathischer Effekt (cpe) oder Plaquebildung sichtbar wird. Dann werden die Zellen lysiert, eine Verdünnungsreihe aus dem Zelllysate hergestellt und ein Plaque-Test auf geeigneten Zellen durchgeführt. Für den Plaque-
5 test wird ein Agarosemedium-Gemisch zugegeben, das beispielsweise ungefähr 0,3 mg/ml Bluo-Gal (GIBCO) enthalten kann um blaue Plaques zu identifizieren, die z.B. LacZ-exprimierende, MPA-resistente rekombinante Viren enthalten. Die so erhaltenen rekombinanten Viren werden zur Infektion von geeigneten Zellen wie beispielsweise Rindernierenzellen, eingesetzt und mindestens zwei weiteren Plaque-
10 titrationen unterzogen bis eine möglichst homogene, am günstigsten >99,9%ige, rekombinante Viruspopulation vorliegt.

Herstellung eines rekombinanten Virus, das Sequenzen enthält, deren Genprodukte oder Teile davon für ein organ-, gewebs- oder zellspezifisches Targeting notwendig
15 sind.

Für die Herstellung des rekombinanten Virus mit Targetingsequenzen geht man analog vor. Als Ausgangsvirus wird ein wie oben beschrieben verändertes Virus verwendet. Anstelle des Plasmids, das deletierte oder verkürzte Sequenzen von Parapoxvirus ovis enthält, verwendet man ein entsprechendes Plasmid, das eine unver-
20 änderte oder in geeigneter Weise veränderte DNA-Sequenz enthält, die für ein Protein oder Peptid kodiert, das ein organ-, gewebs und/oder zellspezifisches Targeting des rekombinanten Virus in nicht inaktivierter oder in inaktivierter Form ermöglicht. Dies kann z.B. für den Fall, daß man das rekombinante Virus in die
25 Leber bringen möchte, beispielsweise die Sequenz für das große Hüllprotein des Hepatitis B Virus des Menschen oder eine andere geeignete Sequenz sein.

Die Wahl der Selektionsmarker ist bei der Herstellung so zu treffen, daß man nicht oder nur in geeigneter Art und Weise mit bereits vorhandenen Selektionsmarkern
30 interferiert.

Analog können zusätzlich Sequenzen eingeführt werden, die für immunologisch aktive Epitope kodieren. Solche Epitope können mit dem Fachmann bekannten Methoden ausgewählt werden ⁹⁾.

5 Nachweis der Targetingeigenschaften des rekombinanten Virus.

Die neuen Eigenschaften des rekombinanten Virus werden einerseits bei diesem Virus mittels dem Fachmann bekannter geeigneter Methoden wie beispielsweise der Verwendung von Selektionsmarkern nachgewiesen und/oder dem Nachweis des neuen Proteins/Peptides erfolgt mittels Western-Blot., Andererseits kann ein funktioneller Nachweis erfolgen. Dieser wird an Zielzellen des Targeting geführt. Im Falle eines Lebertargeting mit einem rekombinanten Virus, das Asialoglycoprotein oder entsprechende Teile davon enthält kann dieser funktionelle Nachweis durch Bindung von rekombinantem Virus an Zellen, die den Asialoglycoprotein-Rezeptor exprimieren, nachgewiesen werden. Dies können humane Leberzellen oder

10 Hepatomazellen (z.B. HepG2) sein, bei denen mit Asialoglycoprotein und rekombinantem Virus kompetitive Bindungsstudien durchgeführt werden können.

15

Zur Kontrolle erfolgen diese Studien auch an Zellen, die den Asialoglycoproteinrezeptor nicht exprimieren, beispielsweise Fibroblasten. Die Targetingeigenschaften sind sowohl bei inaktivierten als auch bei nicht inaktivierten rekombinanten Viren vorhanden. Für eine Therapie werden allerdings nur solche rekombinante Viren verwendet, bei denen die Targetingeigenschaften entsprechend der therapeutischen Zielstellung nachgewiesen werden konnten.

20

25 Nachweis der immunmodulatorischen Eigenschaften

Der Nachweis der immunmodulatorischen Eigenschaften des rekombinanten Virus kann experimentell beispielsweise in Mäusen erfolgen. Dafür wird Mäusen beispielsweise Balb/c Mäusen, das rekombinante Virus in inaktivierter oder nicht inaktiverter Form beispielsweise in eine Körperhöhle, z.B. intraperitoneal oder subcutan, intramuskulär oder intravenös, injiziert. Nach einem festzulegenden Zeitschema,

30 beispielsweise 6, 12, 24 Stunden nach der Applikation, werden die Tiere getötet, und

es werden Organe und/oder Zellen, beispielsweise Zellen, die durch peritoneale Lavage gewonnen werden, entnommen. Aus den Organen/Zellen wird genetisches Material wie beispielsweise RNA isoliert und die Zytokinexpression mittels geeigneter Methoden wie beispielsweise durch Semiquantitative oder quantitative PCR bestimmt.

Für eine Therapie werden dann diejenigen rekombinante Viren verwendet, bei denen die immunmodulatorischen Eigenschaften (Induktion einer Th1 Immunantwort) einen therapeutischen Effekt erwarten lassen.

10

Unter Zugrundelegung der bekannten Zusammenhänge vom Einfluß einer Th1 Immunantwort auf latente und chronisch persistente Virusinfektionen ^{10,11)}.

und der im Vergleich zu nichtrekombinantem Parapoxvirus ovis ähnlichen oder besseren immunmodulatorischen Eigenschaften des rekombinanten Parapoxvirus ovis ist der Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zell-spezifischem rekombinanten Parapoxvirus ovis als Monotherapie oder in Kombination mit biologisch aktiven, z.B. antiviralen, niedermolekularen Verbindungen an Mensch und Tier möglich und von therapeutischem Nutzen zur antiviralen Therapie von vorwiegend chronischen Infektionen mit dem Hepatitis B Virus; anderen viralen Infektionen der inneren Organe, namentlich der Leber, wobei beispielhaft das Hepatitis C Virus (HCV), oder alle anderen Erreger aus der Gruppe der Hepatitis verursachenden Viren genannt seien ¹²⁾, Infektionen, auch in Begleitung anderer Erkrankungen, mit den verschiedenen Typen des Herpes simplex Virus (HSV); den verschiedenen Typen von humanem Papillomvirus (HPV); dem humanem Immundefizienzvirus (HIV); dem humanem Cytomegalievirus (HCMV); sowie den entsprechenden Viruserkrankungen beim Tier.

20

25

30

Des weiteren können mit dem rekombinanten Parapox virus aufgrund des gezeigten Wirkmechanismus insbesondere die folgenden prophylaktischen oder therapeutischen Behandlungen erfolgversprechend durchgeführt werden:

Verhinderung von Rekurrenzen bei Herpesvirus-Infektionen, Metaphylaxe, d.h. Verhinderung der Etablierung von viralen Infektionen (z.B. HIV), wenn unmittelbar nach der Exposition mit dem Mittel behandelt wird ¹³⁾. Die Behandlung von Krebs ist aufgrund des Wirkmechanismus ebenfalls möglich ^{14, 15)}.

5

Die Behandlung entzündlicher und nichtentzündlicher degenerativer und proliferativer Erkrankungen der Leber wie beispielsweise der Leber-Zirrhose, und/oder der Leber-Fibrose mit rekombinantem Parapoxvirus ovis ist ebenfalls möglich.

10

Entsprechend der klinischen Fragestellung (z.B. chronische Hepatitis B Virus Erkrankung des Menschen) wird rekombinantes Virus zur organ- gewebs- und/oder zell-spezifischen Therapie hergestellt.

15

Man verfährt so, daß Gene, die nicht für eine Induktion einer zellvermittelten Immunantwort notwendig sind, deletiert oder mutiert werden. In diese Gene oder freien Genabschnitte setzt man dann die für Epitope (Peptide /Proteine) kodierenden Gensequenzen ein, die eine spezifische Interaktion mit einem oder mehreren Rezeptoren auf den Ziel-Zellen,-Geweben oder -Organen gewährleisten.

20

Zusätzlich kann durch geeignete immunologisch wirksame Epitope (z.B. Epitope des HBV), die zellvermittelte Immunantwort gegen einen Erreger spezifisch verstärkt werden.

25

Dazu wird das organ-, gewebs- und/oder zell-spezifisch interagierende/bindende rekombinante Parapoxvirus ovis zusätzlich mit spezifischen gegen einen oder mehrere Erreger gerichteten,- Immunantwort potenzierenden Epitopen ausgestattet und in der betreffenden Indikation eingesetzt (beispielsweise gegen eine oder mehrere der oben genannten Viruserkrankungen wie beispielsweise der chronische Hepatitis B Erkrankung des Menschen).

30

Je nach klinischer Fragestellung bzw. ätiologisch beteiligtem Virus wird das rekombinante Parapoxvirus ovis in inaktivierter oder nicht inaktivierter Form systemisch (z.B. intramuskulär, subcutan, intraperitoneal, intravenös) oder lokal (z.B. in das betreffende Organ) appliziert.

5

Das rekombinante Parapoxvirus ovis liegt dabei entweder lyophilisiert vor und wird unmittelbar vor der Applikation in einem geeignetem Lösungsmittel suspendiert oder aber es liegt in einer anderen geeigneten Formulierung vor.

10

Mehrere Applikationen bis hin zur kontinuierlichen Infusion nach Zeitschemen, die den Erfordernissen der klinischen Fragestellungen entsprechen, können dabei notwendig sein.

1. Guidotti et al. (1996): Viral cross talk: Intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver
- 5 2. Guidotti et al. (1994): Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice
3. Steinmassl, G., G. Wolf (1990): Bildung von Interleukin 2 und Interferon- γ durch mononukleäre Leukozyten des Schweines nach in vitro-Stimulation mit verschiedenen Viruspräparaten. J.Vet.Med.B37,5,321-331
- 10 4. Robinson, A.J. and Lyttle, D.J. (1992): Parapoxviruses: their biology and potential as recombinant vaccines. In: Recombinant Poxviruses, Chapter 9, 306-317 eds. M. Binns and G. Smith CRC Press, Boca Raton und WO 97/37031
- 15 5. Ishikawa, T. and Ganem, D. (1995): The pre-S domain of the large viral envelope protein determines host range in avian hepatitis B viruses. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 92 (14):6259-6263
- 20 6. Harris, J.D. and Lemoine, N.R. (1996): Strategies for targeted gene therapy. Trends in Genetics 12 (10): 400-405
7. Rensen, P.C.N., de Vruet, L.A. and van Berkel, T.J.C.(1996): Targeting Hepatitis B Therapy to the Liver. Clin. Pharmacokinet. 31 (2)131-155
- 25 8. Barry, B.A., Dower, W.J. and Johnston, S.A. (1996): Toward cell-targeting gene therapy vectors: Selection of cell-binding peptides from random peptide-presenting phage libraries. Nature Medicine 2 (3):299-305
- 30 9. Kern, F., Surel, I.P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blasczyk, R., Reinke, P., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., Walden, P.,

Volk, H.D. (1998): T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat. Med.* 4 (8): 975-978

- 5 10. P. Lucin, S. Jonjic, M. Messerle, B. Polic, H. Hengel, U.H. Koszinowski (1994): Late-Phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha. *J. Gen. Virol* 75:101-110; P.M.
- 10 11. Smith, R.M. Wolcott, R. Chervenak, S.R. Jennings (1994): Control of acute cutaneous herpes-simplex virus-Infection - T-cell mediated viral clearance is dependent upon interferon gamma. *Virology* 202 (1):76-88]
- 15 12. Y. Kawanashi, N. Hayashi, K. Katayama, K. ueda, T. Takehara, E. Miyoshi, E. Mita, A. Kasahara, H. Fusamoto, T. Kamada (1995): Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma inhibit synergistically viral replication in hepatitis B virus replicating cells. *J. Medical Virology* 47 (3):272-277
- 20 13. Dhawan, S., L.M. Wahl, A. Heredia, Y.H. Zhang, J.S. Epstein, M.S. Meltzer, I.K. Hewlett (1995): Interferon gamma inhibits HIV-induced invasiveness of Monocytes. *J. Leukocyte Biology*, 58 (6):713-716
- 25 14. J.F. Bromberg, C.M. Horvath, Z.L. Wen, R.D. Schreiber, J.E.Darnell (1996): Transcriptionally active stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *PNAS* 93(15):7673-7678;
15. M.Klouche, H.Kirchner, F.Holzel (1994): Antiproliferative effects of interferon gamma in combination with alpha-difluoromethylornithine on human carcinoma cell cultures. *J.Cancer Research and Clinical Oncology* 120(12):706]

Patentansprüche

5

1. Verwendung von rekombinantem Parapoxvirus mit Targetingeigenschaften zur Herstellung von Arzneimitteln
2. Arzneimittel enthaltend rekombinantes Parapoxvirus mit Targetingeigenschaften

Organ-, gewebs- und zellspezifisches Immuntherapeutikum für chronische virale Infektionen, sowie entzündliche, degenerative und proliferative Erkrankungen insbesondere der Leber sowie Krebs auf der Basis von rekombinantem Parapoxvirus

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung und Einsatz von organ-, gewebs- und/oder zellspezifischem rekombinanten Parapoxvirus ovis als Erreger- und organ-spezifisches, zielgerichtetes Immuntherapeutikum für chronische virale Infektionen, sowie entzündliche, degenerative, proliferative Erkrankungen insbesondere der Leber, und Krebs.